

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07539

研究課題名（和文）エピソード記憶形成における歯状回カンナビノイドシグナルの役割解明

研究課題名（英文）The role of dentate cannabinoid signaling in episodic memory formation

研究代表者

神出 誠一郎（Jinde, Seiichiro）

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30376454

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では最新のイメージング技術と遺伝子改変技術を用いて、エピソード記憶における海馬歯状回の内因性カンナビノイドシグナルの役割を検討した。苔状細胞への内因性カンナビノイドシグナルを行動課題中のマウスで観察したところ、苔状細胞の活動とは異なるタイミングでシグナルが観察されることが明らかとなった。さらに歯状回の内因性カンナビノイドシグナルが低下したマウスでは、恐怖条件付けの一部の学習が障害されていた。したがって、苔状細胞-顆粒細胞シナプスの内因性カンナビノイドシグナルは苔状細胞の活動とは異なるタイミングで活性化し、エピソード記憶を制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海馬歯状回における内因性カンナビノイドシグナルとエピソード記憶との関連はこれまで明らかでなかった。本研究では、内因性カンナビノイドに深く関わりと考えられる苔状細胞のカンナビノイドシグナルを可視化し、行動実験を行うことで、エピソード記憶における歯状回の役割の一端を明らかにした。特にカンナビノイドシグナルに深く関わる苔状細胞-顆粒細胞シナプスでは、苔状細胞の活動性とは異なるタイミングで内因性カンナビノイドシグナルが活性化し、エピソード記憶処理のプロセスを修飾している可能性が示されたことは、ヒトの記憶のメカニズム解明に迫り、学術的な意義だけでなく、新たな治療法への道筋など社会的にも大きな意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the role of endocannabinoid signals in the hippocampal dentate gyrus in episodic memory processing using fluorescent imaging and transgenic mice. Our results suggested that endocannabinoid signals in mossy cells were activated independently of mossy cell activity. Furthermore, using transgenic mice in which endocannabinoids were not generated, we found that a part of fear memory processing was impaired in these transgenic mice. Taken together, this study suggests that the endocannabinoid signaling in mossy cells in the dentate gyrus is activated independently of mossy cell activity, and episodic fear memory is partly processed by the endocannabinoid signaling at mossy cell-granule cell synapses.

研究分野：精神医学

キーワード：海馬 苔状細胞 顆粒細胞 カンナビノイド イメージング 記憶学習

1. 研究開始当初の背景

大麻に含まれる精神作用物質のカンナビノイドは古くから様々な精神症状との関連が知られていた。その後内因性カンナビノイドの存在が明らかになり、逆行性伝達物質として中枢神経系でカンナビノイド CB1 受容体を介した幅広い作用が報告されている。中でも記憶・学習への作用機序は精神疾患の認知機能障害の病態や創薬にも重要な課題である。CB1 受容体は記憶の中核である海馬に多く発現し、特に海馬への情報入力を担う歯状回の苔状細胞軸索終末が主要部位(下記文献 1)とされるが、記憶と詳細な関連はまだ不明である。

一方、苔状細胞は海馬歯状回門部の主要細胞であるが、解剖学的に薬理学的操作や電気生理学的解析が難しく、長くその特徴は不明であった。申請者は 2012 年に苔状細胞特異的除去マウスを作成し、苔状細胞除去後に歯状回の興奮性増加とパターン分離機能の低下を明らかにして、苔状細胞が歯状回機能を通じてエピソード記憶に深く関わることを世界に先駆けて示した(下記文献 2)。これを契機に苔状細胞の記憶・学習における役割解明に注目が集まっているが、苔状細胞神経終末における CB1 受容体の記憶機能との詳細な関連は明らかでない。

文献: 1) Uchigashima et al., J Neurosci, 2011、2) Jinde et al., Neuron, 2012

2. 研究の目的

先駆的な遺伝子工学とイメージング技術を用い、覚醒下で苔状細胞の内因性カンナビノイドシグナルの *in vivo* イメージングを行うことで、エピソード記憶の形成に関わる苔状細胞の活動とそれに伴う苔状細胞-顆粒細胞間の内因性カンナビノイドシグナルの特徴を解明する。合わせて、歯状回機能に深く関わりとされるパターン分離や、記憶の消去に伴う内因性カンナビノイドシグナルの変化も検討する。また、海馬歯状回の各細胞サブタイプに特異的な CB1 受容体遺伝子もしくは内因性カンナビノイド産生酵素の発現操作により、歯状回の各細胞サブタイプの神経終末で CB1 受容体の発現もしくは内因性カンナビノイドの産生が抑制された際に生じる記憶形成の変化を明らかにする。

これらの結果により歯状回各細胞サブタイプの内因性カンナビノイドシグナルによるエピソード記憶形成への影響を詳細に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) モデル動物作成と自由行動下での *in vivo* カンナビノイドイメージングの確立

苔状細胞特異的 cre 組み換え酵素発現マウス (mossy cell-cre マウス) を用い、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに CB1 受容体を改変した内因性カンナビノイドセンサーである GRABeCB を組み込んだもの (AAV-Syn-flex-GRABeCB センサー) を歯状回へ定位的に注入し、GRABeCB センサーを苔状細胞特異的に発現させる。作成したマウスを用い、マイクロエンドスコープをマウス歯状回内側分子層に設置し、10-20 分の自由行動時における苔状細胞の GRABeCB センサーの活性を記録する。

(2) モデル動物作成と自由行動下での *in vivo* 苔状細胞カルシウムイメージング

mossy cell-cre マウスを用い、AAV ベクターにカルシウムセンサー GCaMP6f を組み込んだものを歯状回へ定位的に注入し、GCaMP6f センサーを苔状細胞特異的に発現させる。作成したマウスを用い、マイクロエンドスコープをマウス歯状回内側分子層に設置し、10-20 分の自由行動時における苔状細胞のカルシウムイメージングを記録する。

(3) 行動実験とイメージング

上記(1)の手法にて以下 a-c の行動実験中の内因性カンナビノイドのイメージングを行う

痕跡恐怖条件付けでの *in vivo* イメージング

痕跡恐怖条件付けは以下の全 5 分のセッションで行う。2 分の馴化 20 秒の音提示 音が終了して 20 秒後に 2 秒間のフットショック (0.75mA) フットショック終了の 20 秒後に 2 回目の 20 秒の音提示を開始、と繰り返し、全部でフットショックは 3 回施行。翌日フットショックと同じチャンバーにマウスを置き、恐怖反応(すくみ反応)を 5 分間観測する。

パターン分離時の内因性カンナビノイドシグナル活性の観測

フットショック翌日にマウスを 2 群に分け、それぞれフットショックと同じチャンバーと、それとは壁面や匂いなどが異なるチャンバーにマウスを置き、2 分間すくみ反応を観測する。似ているが少し異なるコンテキストを見分ける際の GRABeCB センサー活性について検討を行う。

記憶の消去過程における内因性カンナビノイドシグナル活性の変化

フットショック翌日にすくみ反応を確認の後、3 日目以降に異なるチャンバー内で音提示のみでフットショックを与えずに 10 分間過ごすことを 5 日間繰り返す。記憶の消去過程で生じる GRABeCB センサー活性の変化を観察し、検討を行う。

(4) 細胞特異的遺伝子発現操作と記憶学習の関連

顆粒細胞特異的に cre 組み換え酵素を発現する Pro-opiomelanocortin (POMC) -Cre マウスと内因性カンナビノイド 2-arachidonoylglycerol(2-AG)の産生酵素 Diacylglycerol lipase (DGL)の flox マウス (DGL flox マウス)を用いて歯状回顆粒細胞でのみ内因性カンナビノイドが産生できない顆粒細胞特異的 DGL ノックアウトマウスを作成する。このマウスでは苔状細胞-歯状回顆粒細胞間における内因性カンナビノイドシグナルが欠損しているため、このマウスを用いて上記の記憶学習機能について検討する。対照群として、Cre 遺伝子を発現していない DGL flox マウスを使用する。

4. 研究成果

本研究では、海馬が関連しているエピソード記憶の形成や想起、消去時における苔状細胞-顆粒細胞間の内因性カンナビノイドシグナルに注目し、in vivo イメージングと遺伝子改変技術を用いてエピソード記憶への苔状細胞軸索終末の内因性カンナビノイドシグナルの役割を詳細に検討した。以下にその成果を述べる。

(1) 内因性カンナビノイドシグナルの可視化

Mossy cell-cre マウスとウイルスによる遺伝子導入を組み合わせた手法により、歯状回苔状細胞に選択的に GRABeCB センサーを発現させたマウスを作成した。歯状回直上に埋め込んだレンズにより 2 光子顕微鏡を用いて、麻酔下のマウスの歯状回苔状細胞に顆粒細胞から入力する内因性カンナビノイドシグナルによる蛍光強度の変化がみとめられ、in vivo で歯状回苔状細胞に入力する内因性カンナビノイドシグナルを検出できた。次に自由行動下で微小顕微鏡を用いて記録を行い、内因性カンナビノイドシグナルによる蛍光強度の変化が認められた。

(2) 記憶学習におけるカンナビノイドシグナルの変化

下肢への電気刺激と音を用いた恐怖条件付け課題を行った際の苔状細胞特異的な CB1 受容体活性のイメージングを行ったが、条件付け学習の獲得において、カンナビノイドシグナルの明らかな蛍光変化は認められなかった。

次に、条件付けとは異なる環境に暴露した場合の CB1 受容体活性のイメージングや、消去学習課題中の CB1 受容体活性のイメージングを行った。その結果、一部のマウスにおいて、消去課題中のすみ行動時に苔状細胞-顆粒細胞間における内因性カンナビノイドのシグナルの活性化が認められた。

一方、カルシウムイメージングによって苔状細胞の活動自体を記録したところ、マウスが動いているときに苔状細胞の活動が認められた。

したがって苔状細胞-顆粒細胞シナプスの内因性カンナビノイドシグナルは、苔状細胞の活動に応じて苔状細胞から顆粒細胞への入力をオンデマンドで調節するのではなく、苔状細胞の活動とは独立に顆粒細胞の活動によって活性化されている可能性が示唆された。

(3) カンナビノイド産生酵素の条件的遺伝子ノックアウトによる記憶学習の変化

上記(2)の結果を踏まえ、苔状細胞-顆粒細胞シナプスの内因性カンナビノイドシグナルの役割を明らかにするために、歯状回顆粒細胞でのみ内因性カンナビノイドが産生できない顆粒細胞特異的 DGL ノックアウトマウスを作成し恐怖条件付け課題およびその消去課題を行った。すると、このマウスでは恐怖条件付けの消去学習が障害されていた。

したがって、苔状細胞-顆粒細胞シナプスの内因性カンナビノイドシグナルは苔状細胞の活動とは異なるタイミングで活性化し、苔状細胞-顆粒細胞シナプスの可塑性を変化させることで消去学習を促進している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅谷 佑樹
2. 発表標題 Granule cells in the dentate gyrus produce 2-arachidonoyl glycerol and ameliorates kainate-induced seizures.
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	菅谷 佑樹 (Sugaya Yuki) (00625759)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------